

JP07075578A

MicroPatent Report

**DNA FRAGMENT CONTAINING GENE CODING
DIHYDRODIPICOLINIC ACID REDUCTASE AND UTILIZATION
THEREOF**

[71] Applicant: MITSUBISHI CHEM

[72] Inventors: MADORI MIWA;
KOBAYASHI MIKI;
YUGAWA HIDEAKI

[21] Application No.: JP05223501

[22] Filed: 19930908

[43] Published: 19950320

ABSTRACT: A DNA fragment containing a gene coding dihydrodipicolinic acid reductase from Brevibacterium-flavum, and capable of transforming a Coryne type bacteria to produce useful products such as L-lysine, etc., in a high efficiency. CONSTITUTION: A novel DNA fragment expressed by formula, etc., containing a gene coding dihydrodipicolinic acid reductase (EC-1. 3. 1. 26), derived from a Brevibacterium-flavum [[e.g. Brevibacterium-flavum MJ-233 (FERM-BP-1497), etc.]. The enzyme is obtained as a form of an objective DNA fragment, by culturing Brevibacterium-flavum MJ-233 until the logarithmic growth phase, collecting the microbial cells, suspending them in a solution containing a lysozyme, further adding protease K and a surface active agent to subject them to bacteriolysis, collecting genes from the bacteriolytic solution by a conventional procedure, treating the genes with a restriction enzyme, and selecting a DNA coding dihydrodipicolinic acid reductase.

Go to Fulltext

[57] Abstract:

PURPOSE: To obtain the DNA fragment containing a gene coding dihydrodipicolinic acid reductase from Brevibacterium-flavum, and capable of transforming a Coryne type bacteria to produce useful products such as L-lysine, etc., in a high efficiency. **CONSTITUTION:** A novel DNA fragment expressed by formula, etc., containing a gene coding dihydrodipicolinic acid reductase (EC-1. 3. 1. 26), derived from a Brevibacterium-flavum [[e.g. Brevibacterium-flavum MJ-233 (FERM-BP-1497), etc.]. The enzyme is obtained as a form of an objective DNA fragment, by culturing Brevibacterium-flavum MJ-233 until the logarithmic growth phase, collecting the microbial cells, suspending them in a solution containing a lysozyme, further adding protease K and a surface active agent to subject them to bacteriolysis, collecting genes from the bacteriolytic solution by a conventional procedure, treating the genes with a restriction enzyme, and selecting a DNA coding dihydrodipicolinic acid reductase.

[51] Int'l Class: C12N01509 C12N00121 C12N01509 C12R00113
C12N00121 C12R00115

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-75578

(43) 公開日 平成7年(1995)3月20日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	7236-4B		
1/21				
// (C 1 2 N 15/09	Z N A	9050-4B	C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
			(C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 13 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平5-223501

(22) 出願日 平成5年(1993)9月8日

(71) 出願人 000006057

三菱油化株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72) 発明者 真島 英翰

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72) 発明者 小林 幹

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72) 発明者 湯川 英明

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(74) 代理人 弁理士 曾我 道照 (外6名)

(54) 【発明の名称】 ジヒドロピコリン酸レダクターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片およびその利用

(57) 【要約】

【構成】 プレバクテリウム・フラバムJ-233の染色体DNAから得られ、ジヒドロピコリン酸レダクターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片、該DNA断片が導入された組換えプラスミド、および該組換えプラスミドにより形質転換されたコリネ型細菌。

【効果】 該DNA断片が導入された組換えプラスミドにより形質転換されたコリネ型細菌を用いることで、従来よりも高効率に有用微生物産物を生産することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 プレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) 由来のジヒドロジピコリン酸レダクターゼ (EC 1.3.1.26) をコードする遺伝子を含むDNA断片。

【請求項2】 前記プレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) がプレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ-233である請求項1に記載のDNA断片。

【請求項3】 次のDNA塩基配列：

```

ATGGAATCA AGGTTGGCGT TCTGGAGGCC AAAGGCCGTG TTGTCAAAC TATTGTGGCA 60
GCAGTCAATG AGTCOGATGA TCTGGAGCTT GTTGACAGAGA TCGGCGTGA CGATGATTTG 120
AGCCTTCTGG TAGACAACGG CGCTGAAGTT GTGTTGACT TCACCACTCC TAACGCTGTG 180
ATGGGCAACC TGGAGTTCTG CATCAACAAC GGCATTCTG CGTTGTGTG AACCAAGGGC 240
TTGATGATG CTGTTTGA GCAGGTTCCG GCTTGGCTTG AAGGAAAAGA CAATGTCCGT 300
GTTCTGATCG CACCTAATT TGCTATCTCT GCGGTGTGA CCATGGTCTT TTCCAAGCAG 360
GCTGCGCGCT TCTTGAATC AGCTGAAGTT ATTGAGCTGC ACCACCCCAA CAAGCTGGAT 420
GCACCTTCAG GCACCGGAT CCACACTGCT CAAGGCATTG CTGCGGCACG AAAAGAAGCA 480
GGCATGGACG CACAGCCAGA TGCGAOCGAG CAGGCACCTG AGGGTTCCCG TGGCGCAAGG 540
TTAGATGAA TCCAGTTCA CGCAGTCCGG ATGTCCGGCA TGGTTGCTCA CGAGCAAGTT 600
ATCTTTGGCA CCCAGGTCA GACCTTGACC ATCAAGCAGG ACTCTATGA TCGCAACTCA 660
TTTGACCAG GTGTCTTGGT GGGTGTGGC AACATTGCAC AGCACCAGG CCTAGTCGTA 720
GGACTTGAGC ATTAOCTAGG CTTGTAA 747

```

で表されるジヒドロジピコリン酸レダクターゼ (EC 1.3.1.26) をコードする遺伝子を含むDNA断片。

【請求項4】 次のアミノ酸配列：

```

Met Gly Ile Lys Val Gly Val Leu Gly Ala Lys Gly Arg Val Gly Gln
  1           5           10          15
Thr Ile Val Ala Ala Val Asn Glu Ser Asp Asp Leu Glu Leu Val Ala
          20          25          30
Glu Ile Gly Val Asp Asp Asp Leu Ser Leu Leu Val Asp Asn Gly Ala
          35          40          45
Glu Val Val Val Asp Phe Thr Thr Pro Asn Ala Val Met Gly Asn Leu
          50          55          60
Glu Phe Cys Ile Asn Asn Gly Ile Ser Ala Val Val Gly Thr Thr Gly
          65          70          75          80
Phe Asp Asp Ala Arg Leu Glu Gln Val Arg Ala Trp Leu Glu Gly Lys
          85          90          95
Asp Asn Val Gly Val Leu Ile Ala Pro Asn Phe Ala Ile Ser Ala Val
          100         105         110
Leu Thr Met Val Phe Ser Lys Gln Ala Ala Arg Phe Phe Glu Ser Ala
          115         120         125
Glu Val Ile Glu Leu His His Pro Asn Lys Leu Asp Ala Pro Ser Gly
          130         135         140
Thr Ala Ile His Thr Ala Gln Gly Ile Ala Ala Ala Arg Lys Glu Ala
          145         150         155         160
Gly Met Asp Ala Gln Pro Asp Ala Thr Glu Gln Ala Leu Glu Gly Ser
          165         170         175
Arg Gly Ala Arg Leu Asp Gly Ile Pro Val His Ala Val Arg Met Ser
          180         185         190
Gly Met Val Ala His Glu Gln Val Ile Phe Gly Thr Gln Gly Gln Thr
          195         200         205
Leu Thr Ile Lys Gln Asp Ser Tyr Asp Arg Asn Ser Phe Ala Pro Gly
          210         215         220
Val Leu Val Gly Val Arg Asn Ile Ala Gln His Pro Gly Leu Val Val
          225         230         235         240

```

で表されるジヒドロジビコリン酸レダクターゼ (EC 1.3.1.26) をコードする遺伝子を含むDNA断片。

【請求項5】 両末端に制限酵素 Hind III 認識部位

制限酵素	認識部位数
<u>Cla I</u>	1
<u>Xba I</u>	1
<u>Pst I</u>	2
<u>Dra I</u>	1

【請求項6】 請求項1～5のいずれかひとつに記載のDNA断片が導入された組換えプラスミド。

【請求項7】 請求項1～5のいずれかひとつに記載のDNA断片とコリネ型細菌内で複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNA断片を保有する組換えプラスミド。

【請求項8】 請求項6～7のいずれかひとつに記載の組換えプラスミドにより形質転換されたコリネ型細菌。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ジヒドロジビコリン酸レダクターゼ (EC 1.3.1.26) をコードする遺伝子を含むコリネ型細菌由来のDNA断片およびその利用に関し、より詳しくは、ジヒドロジビコリン酸レダクターゼをコードする遺伝子を含むプレバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) 由来のDNA断片、該DNA断片を保有する組換えプラスミド、および該プラスミドにより形質転換されたコリネ型細菌に関する。

【0002】

【従来の技術】 ジヒドロジビコリン酸レダクターゼ (EC 1.3.1.26) は、医薬や食品添加物として用いられるL-リジンの生合成に関与する工業的に有用な酵素である。ジヒドロジビコリン酸レダクターゼをコードする遺伝子としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) 由来の遺伝子 (J. Biol. Chem., 259, 14829-14834, 1988参照)、およびコリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) 由来の遺伝子 (Mol. Genet. r. Genet., 220, 478-480, 1990 参照) についての報告例はあるものの、本発明者らの知る限りでは、産業上重要な微生物であるプレバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) 由来のジヒドロジビコリン酸レダクターゼをコードする遺伝子についての報告例は見当たらない。一方、従来提案されている微生物を用いるL-リジンの製造法では、L-リジンの蓄積等に限界があり、新たな観点から遺伝子工学的的手法による菌株の改良も含め、L-リジンをより効率的に生成させる方法の提供が強く求められている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、コリネ型細菌に属するプレバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) 由来のジヒドロジビコリン酸レダ

クターゼを有し、下記の制限酵素で切断した場合に、下記の認識部位数と切断断片の大きさを示す請求項2に記載のDNA断片：

切断断片の大きさ (kb)

0.7, 2.8
1.5, 2.0
0.25, 0.5, 2.75
1.2, 2.3

クターゼをコードする遺伝子を単離し、該遺伝子を同種であるコリネ型細菌に導入し、該コリネ型細菌を用いて新たな観点から効率的にL-リジンを製造することである。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは上記目的を達成すべく鋭意研究を行った結果、コリネ型細菌染色体からジヒドロジビコリン酸レダクターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を単離し、該DNA断片を適当なベクタープラスミドに導入してコリネ型細菌を形質転換し、該形質転換されたコリネ型細菌がL-リジンの中間体であるテトラヒドロジビコリン酸の高生産能力を有することを見だし、本発明を完成するに至った。即ち本発明は、(1) プレバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) 由来のジヒドロジビコリン酸レダクターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片、(2)

該DNA断片を保有する組換えプラスミド、(3) 該組換えプラスミドにより形質転換されたコリネ型細菌、を提供するものである。本発明の上記DNA断片を用いることにより、コリネ型細菌内でジヒドロジビコリン酸レダクターゼを高生産し得るベクタープラスミドを造成することができ、このベクタープラスミドでコリネ型細菌を形質転換することにより、リジン生合成経路の中間体であるテトラヒドロジビコリン酸の高生産能力を有するコリネ型細菌を育種することが可能である。かくして育種されたコリネ型細菌を用いてL-リジンを効率的に製造することができる。以下に、本発明についてさらに詳細に説明する。

【0005】

【本発明の具体的説明】 本発明の、ジヒドロジビコリン酸レダクターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片 (以下これを「A断片」と略称することがある。) とは、ジヒドロジビコリン酸を還元して、テトラヒドロジビコリン酸を合成する酵素、即ちジヒドロジビコリン酸レダクターゼ (EC 1.3.1.26) をコードする遺伝子DNAを含むDNA断片を意味する。

【0006】 本発明のジヒドロジビコリン酸レダクターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片はその塩基配列が決定された後においては合成することも可能であるが、通常は該酵素を生産する微生物から単離およびク

ーニングして取得可能であり、その供給源となる微生物としてはコリネ型細菌、特にブレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ-233 (FERM BP-1497) およびその由来株が好適に用いられる。これら供給源微生物からA断片を調製するための基本的操作の1例を以下に示す。A断片は、上記コリネ型細菌、例えばブレビバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497) 株の染色体DNA上に存在し、その染色体DNAを適当な制限酵素で切断し、生じる切断断片の中から分離、取得することができる。まず、ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233株の培養物から常法により染色体DNAを抽出し、該染色体DNAを適当な制限酵素、例えばHindIIIを用いて完全分解する。次に得られたDNA断片を、適当なマーカー遺伝子を有するベクタープラスミド、例えばカナマイシン耐性遺伝子を有するpHSG298 (宝酒造製) に常法により挿入する。得られたベクタープラスミドを用い、通常の形質転換法、例えば塩化カルシウム法または電気パルス法等により適当な宿主細菌、例えばジヒドロピコリン酸レダクターゼ遺伝子が欠損した大腸菌 (エシエリヒア・コリ) 変異株CGSC4549 [エシエリヒア・コリ ジェネテック・ストック・センター (*Escherichia coli* Genetic Stock Center)、デパートメント・オブ・バイオ

ロジ、エール・ユニバーシティ (Department of Biology, Yale University) : P.O.Box 6666 New-Haven, GT 06511-74, USA 保存菌株] を形質転換し、菌体を選択培地上で培養して形質転換株の有する組換えプラスミドのマーカー遺伝子発現の有無により、形質転換株を分離、取得する。得られた形質転換株より、プラスミドDNAを常法、例えばアルカリ-SDS法等により抽出し、適当な制限酵素で切断する。得られたDNA断片を常法、例えばポリアクリルアミド電気泳動法等により解析することにより、前記プラスミドDNAに挿入されたブレビバクテリウム・フラバムMJ-233株由来のA断片を確認および取得することができる。

【0007】上記手法により得られるA断片の例としては、上記ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAを制限酵素HindIIIにより完全分解して得られる、大きさ約3.5 kbのDNA断片を挙げることができる。このジヒドロピコリン酸レダクターゼをコードする遺伝子を含む大きさが約3.5 kbのDNA断片を各種制限酵素により切断した際の、制限酵素認識部位数および切断断片の大きさを下記表1に示す。

【0008】

【表1】

表 1

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
<u>C</u> la I	1	0.7, 2.8
<u>X</u> ba I	1	1.5, 2.0
<u>P</u> st I	2	0.25, 0.5, 2.75
<u>D</u> ra I	1	1.2, 2.3

【0009】なお、本明細書において、制限酵素による「認識部位数」は、DNA断片またはプラスミドを、制限酵素の存在下で完全分解し、それらの分解物をそれ自体既知の方法に従い1%アガロースゲル電気泳動および4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、分離可能な断片の数から決定した値を採用した。また、「切断断片の大きさ」及びプラスミドの大きさは、アガロースゲル電気泳動を用いる場合には、エシエリヒア・コリのラムダファージ (λ phage) のDNAを制限酵素HindIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一アガロースゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、また、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いる場合には、エシエリヒア・コリのファイ・エックス174ファージ (ϕ x 174 phage) のDNAを制限酵素HaeIIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一ポリアクリルアミドゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、切断DNA断片またはプラスミドの各D

NA断片の大きさを算出する。プラスミドの大きさは、切断断片それぞれの大きさを加算して求める。なお、各DNA断片の大きさの決定において、1 kb以上の断片の大きさについては、1%アガロースゲル電気泳動によって得られる結果を採用し、約0.1 kbから1 kb未満の断片の大きさについては4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって得られる結果を採用した。

【0010】一方、上記したブレビバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAを制限酵素HindIIによって切断することにより得られる大きさが約3.5 kbのDNA断片については、その塩基配列をプラスミドpUC118またはpUC119 (宝酒造) を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法 (dideoxy chain termination method, Sanger, F. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, p5463, 1977) により決定することができる。このようにして決定した上記大きさが約3.5 kbのDNA断片の塩基配列中のオープン・リーディング・フレ

ーム (ORF) の存在から決定したジヒドロジピコリン酸レダクターゼをコードする遺伝子は、249個のアミノ酸をコードする747塩基対から構成されている。その塩基配列を後記配列表の配列番号：1に示す。

【0011】配列番号：1に示される塩基配列を包含してなる本発明のジヒドロジピコリン酸レダクターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片は、天然のコリネ型細菌染色体DNAから単離されたもののみならず、通常用いられるDNA合成装置、例えばアプライド・バイオシステムズ社製394型を用いて合成されたものであってもよい。また、配列番号：1に示される塩基配列を包含してなる本発明のDNA断片は、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼをコードする機能を実質的に損なうことがない限り、塩基配列の一部の塩基が他の塩基で置換されていてもよく、あるいは新たに塩基が挿入されていてもよく、また一部の塩基が欠損または転位していてもよく、これら誘導体のいずれもが、本発明のジヒドロジピコリン酸レダクターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片に包含されるものである。以上に詳述したジヒドロジピコリン酸レダクターゼをコードする遺伝子を含む大きさ約3.5 kbのDNA断片の各種制限酵素による切断点地図を図1に示す。

【0012】本発明のジヒドロジピコリン酸レダクターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片 (A断片) を適当なプラスミドベクター、例えば、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも保有するプラスミドベクターに導入することにより、コリネ型細菌内でジヒドロジピコリン酸レダクターゼを高発現する優れた組換えプラスミドを得ることができる。

【0013】また、本発明のジヒドロジピコリン酸レダクターゼをコードする遺伝子を発現させるためのプロモーターは、コリネ型細菌が保有する該遺伝子自身のプロモーターのみならず、コリネ型細菌内でジヒドロジピコリン酸レダクターゼ遺伝子の転写を開始させ得るプロモーターであれば、原核生物に由来する天然または合成塩基配列であっても、その他のいかなる塩基配列であってもよい。

【0014】本発明のA断片を導入することができ、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも保有するプラスミドベクターとしては、例えば、プラスミドpCRY30 (特開平3-210184号公報)；プラスミドpCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KEおよびpCRY3KX (特開平2-276579号公報)；プラスミドpCRY2およびpCRY3 (特開平1-191686号公報)；プラスミドpAM330 (特開昭58-67679号公報)；プラスミドpHM1519 (特開昭58-77895号公報)；プラスミドpAJ655、pAJ611およびpAJ1844 (特開昭58-192900号公報)；プラスミドpCG1 (特開昭57-134500号公報)；プラスミドpCG2 (特開昭58-

-35197号公報)；プラスミドpCG4およびpCG11 (特開昭57-183799号公報) 等のプラスミドを例示することができる。これらの中でも、コリネ型細菌内でプラスミドの安定化機能を司る遺伝子を含むDNA領域およびコリネ型細菌内で複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNA領域を保有するプラスミドが好ましく、例えば、プラスミドpCRY30、pCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE、pCRY3KX等が好適に用いられる。

【0015】上記プラスミドベクターpCRY30を調製する方法の1例を以下に示す。プレバクテリウム・スタチオニス (*Brevibacterium stationis*) IFO12144 (FERM BP-2515) からプラスミドpBY503 (特開平1-95785号公報) DNAを常法により抽出し、これを制限酵素XhoIで処理して、プラスミド複製増殖機能を司る遺伝子を含む大きさが約4.0 kbのDNA断片を切り出す。同様にして該プラスミドDNAを制限酵素EcoRIおよびKpnIで処理して、プラスミド安定化機能を司る遺伝子を含む大きさが約2.1 kbのDNA断片を切り出す。得られた2つのDNA断片をプラスミドpHSG298 (宝酒造製) のEcoRI-KpnI部位およびSalI部位にそれぞれ組込むことにより、プラスミドpCRY30を調製することができる。

【0016】次に、上記プラスミドベクターへの本発明のA断片の導入は、例えば、プラスミドベクター中に1箇所だけ存在する制限酵素部位を該制限酵素で開裂し、そこに前記A断片および開裂したプラスミドベクターを必要に応じてS1スクレアーゼで処理して平滑末端とするか、または適当なアダプターDNAの存在下にDNAリガーゼ処理で連結させることにより行うことができる。プラスミドpCRY30への本発明のA断片の導入は、プラスミドpCRY30を制限酵素BamHIで開裂させ、そこに前記ジヒドロジピコリン酸レダクターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片 (A断片) をDNAリガーゼで連結させることにより行うことができる。

【0017】かくして造成される本発明のA断片をプラスミドpCRY30に導入した組換えプラスミドは、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼの高産生能力を有しておりL-リジンの製造に好適に利用することができる。本発明者らは、このプラスミドを“プラスミドpCRY30-da pB”と命名した。本プラスミドpCRY30-da pBの作製方法については、後記実施例2にて詳細に説明する。上記手法により造成される本発明のジヒドロジピコリン酸レダクターゼをコードする遺伝子を含むコリネ型細菌内で複製増殖可能なプラスミドを宿主微生物に導入し、該微生物を形質転換して得られる形質転換微生物を用いてL-リジンを安定して効率良く生産することができる。

【0018】本発明による上記組換えプラスミドで形質転換しうる宿主微生物としては、コリネ型細菌、例え

ば、プレバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497)、プレバクテリウム・フラバムMJ-233-AB-41 (FERM BP-1498)、プレバクテリウム・フラバムMJ-233-ABT-11 (FERM BP-1500)、プレバクテリウム・フラバムMJ-233-ABD-21 (FERM BP-1499) 等が挙げられる。なお、上記 FERM BP-1498 の菌株は FERM BP-1497 の菌株を親株としてD- α -アミノ酪酸耐性を積極的に付与されたエタノール産化性微生物である (特公昭59-28398号公報参照)。また、FERM BP-1500 の菌株は FERM BP-1497 の菌株を親株としたL- α -アミノ酪酸トランスアミナーゼ高活性変異株である (特開昭62-51998号公報参照)。さらに、FERM BP-1499 の菌株は FERM BP-1497 の菌株を親株としたD- α -アミノ酪酸デアミナーゼ高活性変異株である (特開昭61-177993号公報参照)。

【0019】上記微生物の他に、プレバクテリウム・アンモニアゲネス (*Brevibacterium ammoniagenes*) ATCC 6871、同 ATCC 13745、同 ATCC 13746、プレバクテリウム・デバリカム (*Brevibacterium divaricatum*) ATCC 4020、プレバクテリウム・ラクトファーメントム (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC 13869、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 31830等を宿主微生物として用いることもできる。なお、宿主としてプレバクテリウム・フラバムMJ-233由来の菌株を用いる場合、本菌株の保有するプラスミドpBY502 (特開昭63-36787号公報参照) のために形質転換が困難な場合があるので、そのような場合には、本菌株よりプラスミドpBY502を除去することが望ましい。プラスミドpBY502を除去する方法としては、例えば、継代培養を繰り返すことにより自然に欠落させることも可能であるし、人為的に除去することも可能である [Bacteriological Review, 36, 361, 1972 参照]。上記プラスミドpBY502を人為的に除去する方法の1例を以下に示す。

【0020】宿主菌プレバクテリウム・フラバムMJ-233の生育を不完全に阻害する濃度、例えば0.2~50 $\mu\text{g/ml}$ 濃度のアクリジンオレンジもしくはエチジウムブロミド等を含有する培地に1ml当たり約10菌体の密度で該宿主菌を植菌し、その生育を不完全に阻害しながら約35℃で約24時間培養する。この培養液を希釈して寒天培地に塗布し、約35℃で約2日間培養する。得られたコロニーから各々独立にプラスミド抽出操作を行ない、プラスミドpBY502が除去されている株を選抜する。この一連の操作により、プラスミドpBY502が除去されたプレバクテリウム・フラバムMJ-233由来株が得られる。

【0021】上記コリネ型細菌への前記組換えプラスミドの形質転換法としては、エシエリヒア・コリ (*E. coli*) およびエルビニア・カロトボラ (*Erwinia carotovora*) について知られているように [N.M. Calvin および P.C.

Hanawalt, J. Bacteriology, 170, 2796, 1988; K. Ito ら, Agricultural and Biological Chemistry, 52, 293, 1988 参照]、DNA受容菌にパルス波を通電する方法 [Y. Satoh ら, J. Industrial Microbiology, 5, 159, 1990] 等を利用することができる。

【0022】上記の方法で形質転換して得られるジヒドロジビコリン酸レダクターゼ高産能を有するコリネ型細菌、例えばプレバクテリウム・フラバムMJ-233に由来する形質転換株の培養方法を、以下に述べる。得られた形質転換コリネ型細菌は、炭素源、窒素源、無機非金属または金属塩、ビタミン類等、該細菌の増殖に必要なかつ十分な栄養成分を含有する培地を用いて、適当な好気、温度、pH条件の下に培養することができる。培地に含有される栄養成分は、培養の開始時に全て添加することもできるし、また培養の進展に伴い逐次または連続的に添加することもできる。

【0023】培地中の炭素源としては、例えば、グルコース、グリセロール、フルクトース、シュクロース、マルトース、澱粉加水分解物、糖蜜等の炭水化物；コハク酸、フマル酸、酢酸、乳酸等の有機酸；エタノール、メタノール等のアルコール類の中から培養対象細菌が産化可能な炭素源を選択して、単独または組合わせて用いることができる。培養開始時の炭素源濃度は1~5容量%であることが好ましく、さらに好ましくは2~3容量%である。窒素源としては、例えば、アンモニアまたは塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、酢酸アンモニウム等の各種無機あるいは有機アンモニウム塩類；尿素等の他の無機含窒素化合物；グルタミン酸等のアミノ酸類；ペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼミノ酸、コーンステープリカー等の含窒素天然栄養源等を用いることができる。

【0024】無機非金属塩または金属塩としては、リン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸アンモニウム、硫酸第一鉄、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化マンガン、硫酸マンガン等を用いることができる。ビタミン類としてはビオチン、チアミンなどを必要に応じて用いるが、含窒素天然栄養源の中にはこれらのビタミン類を含有するものがあるので、これをもってビタミン類の代替とすることも可能である。培養は通常、振盪培養、通気攪拌培養等の好気条件下で行なう。培養温度は一般に約20~40℃、好ましくは約25~35℃に、培地のpHは5~10、好ましくは7~8の中性付近に、それぞれ維持することが好ましい。培地のpH調整は、適当な酸またはアルカリを添加して行うことができる。培養期間は通常1~7日間とすることができる。培養菌体は、培養終了後に遠心分離、膜分離等の適当な手段で培養液から分離回収することができる。

【0025】上記手法で得られる培養物または培養物から得られる菌株を用いて発酵法または酵素法によりレリジンを製造することができる。次に実施例により本発

明をさらに具体的に説明する。当然ながら、下記実施例は本発明について具体的な認識を得る一助としてのみ挙げたものであり、本発明の範囲を何ら限定するものではない。

【0026】

【実施例】

実施例1

ジヒドロジピコリン酸レダクターゼをコードする遺伝子を含むプレバクテリウム・フラバムMJ-233由来のDNA断片(A断片)のクローン化

(A) プレバクテリウム・フラバムMJ-233の全DNAの抽出

半合成培地A培地[組成:尿素 2g、硫酸アンモニウム 7g、リン酸カリウム 0.5g、リン酸二カリウム 0.5g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g、 $MnSO_4 \cdot 4 \sim 6H_2O$ 6mg、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 6mg、酵母エキス2.5g、カザミノ酸 5g、ビオチン 200 μ g、塩酸チアミン 100 μ g、グルコース 20gを蒸留水に溶解して1lとする]1lを用いてプレバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497)を対数増殖期後期まで培養し、培養菌体を回収した。得られた菌体を、リゾチームを10mg/mlの濃度で含有する溶液[組成:10mM NaCl、20mM トリス緩衝液(pH8.0)、1mM EDTA \cdot 2Na]15mlに懸濁した。続いて最終濃度100 μ g/ml量のプロテナーゼKを添加し、37℃で1時間インキュベートした。さらに最終濃度0.5%量のドデシル硫酸ナトリウムを添加し、50℃で6時間インキュベートして溶解した。この溶菌液に、等量のフェノール/クロロホルム溶液(1:1, v/v)を添加し、室温で10分間穏やかに振盪した後、全量を10~12℃で20分間、500 \times gの遠心分離にかけ、その上清画分を分取した。酢酸ナトリウムをその最終濃度が0.3Mとなるように該画分に添加し、次いで2倍量のエタノールを穏やかに添加した。水層とエタノール層との間に存在するDNAをガラス棒で撪め取り、これを70%エタノールで洗浄した後に風乾した。得られたDNAは、溶液[組成:10mM トリス緩衝液(pH7.5)、1mMEDTA \cdot 2Na]5mlを添加して4℃で一晩静置した後、実験に供した。

【0027】(B) ジヒドロジピコリン酸レダクターゼをコードする遺伝子を含む組換えプラスミドの創製および選抜

前記(A)項で得られたプレバクテリウム・フラバムMJ-233の全DNA溶液90 μ lを、50unitの制限酵素HindIIIと37℃で1時間反応させて完全分解した。また、カナマイシン耐性遺伝子を有するクローニングベクターpHSG298(宝酒造製)を制限酵素HindIIIで分解した後、その分解物を脱リン酸化した。得られたそれぞれのDNA分解物溶液を65℃

で10分間加熱して制限酵素を失活させた後に混合し、該液に、それぞれの最終濃度が50mM トリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM $MgCl_2$ 、およびT4DNAリガーゼ1unitとなるように各成分を添加し、4℃で15時間反応させて、DNAを結合させた。

【0028】上記手順により得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法[J. Mol. Biol., 53, 159 (1970)]により前記ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ欠損大腸菌変異株、エシエリヒア・コリ(Escherichia coli) CGSG4549(dapB)〔()内はジヒドロジピコリン酸レダクターゼ遺伝子型を示す〕を形質転換した。形質転換した前記エシエリヒア・コリCGSG4549(dapB)株を、カナマイシン50mgを含有する選択培地[組成: K_2HPO_4 7g、 KH_2PO_4 2g、 $(NH_4)_2SO_4$ 1g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g、グルコース 20gおよび寒天 16gを蒸留水 1lに溶解する]に塗抹した。この培地上に生育したジヒドロジピコリン酸レダクターゼをコードする遺伝子を含むプラスミドを保持する菌株を、常法により液体培養して培養液よりプラスミドDNAを抽出した。抽出したプラスミドを制限酵素により分解し、得られた分解物をアガロースゲル電気泳動に供して解析した結果、プラスミドpHSG298の大きさ2.7kbのDNA断片に加えて、大きさ約3.5kbの挿入DNA断片が認められた。本発明者らは、このプラスミドを“プラスミドpHSG298-dapB”と命名した。

【0029】(C) ジヒドロジピコリン酸レダクターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片(A断片)のサブクローニング

前記(B)で得られたプラスミドpHSG298-dapBに含まれる挿入DNA断片を下記手順にてプラスミドpUC118(宝酒造製)にサブクローニングした。前記プラスミドpHSG298-dapBを制限酵素HindIIIと反応させて言えられる分解物と、プラスミドpUC118を制限酵素HindIIIと反応させて得られる分解物とを混合した。この混合液を65℃で10分間加熱して酵素を失活させた後に、それぞれの最終濃度が50mM トリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM $MgCl_2$ 、およびT4DNAリガーゼ1unitとなるように各成分を添加し、12℃で15時間反応させて、DNA分解物を結合させた。

【0030】得られたプラスミド混液を用いて、塩化カルシウム法[J. Mol. Bio., 53, 159, 1970]により前記エシエリヒア・コリCGSG4345株を形質転換し、カナマイシンを50mg含有する選択培地[組成: K_2HPO_4 7g、 KH_2PO_4 2g、 $(NH_4)_2SO_4$ 1g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g、グルコース 20gおよび寒天 16gを蒸留水に溶解して1lとする]に

塗抹した。この培地上に生育した菌株を常法により液体培養し、該培養液から常法によりプラスミドDNAを抽出した。抽出したプラスミドを制限酵素により分解し、得られた分解物をアガロースゲル電気泳動に供した結果、プラスミドpUC118の大きさ約3.2 kbのDNA断片に加え、大きさ約3.5 kbの挿入DNA断片が認められた。確認された大きさ約3.5 kbの挿入DNA断片を各種の制限酵素で切断したときの制限酵素認

識部位数および切断断片の大きさは前記表1に示したと同一であった。このDNA断片の制限酵素切断点地図を図1に示す。また、上記手法により得られたプラスミドを各種制限酵素で切断したときの制限酵素認識部位数および切断断片の大きさを下記表2に示す。

【0031】

【表2】

表 2

プラスミドpUC118-dapB

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
<u>Cla</u> I	1	6.7
<u>Xba</u> I	2	1.5, 5.2
<u>Pst</u> I	3	0.5, 2.75, 3.45
<u>Hind</u> III	2	3.2, 3.5

【0032】上記表2に示した制限酵素の切断断片により特徴付けられるプラスミドを、“プラスミドpUC118-dapB”と命名した。以上により、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼをコードする遺伝子を含む大きさ約3.5 kbのDNA断片 (HindIII断片; A断片) を取得した。

【0033】実施例2

ジヒドロジピコリン酸レダクターゼをコードする遺伝子のDNA塩基配列の決定

実施例1 (C) 項で得たジヒドロジピコリン酸レダクターゼをコードする遺伝子を含む大きさ約3.5 kbのDNA断片の塩基配列を、プラスミドpUC118またはpUC119を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法 (dideoxy chain termination 法) により、図2に示した戦略図に従って決定した。得られた塩基配列中のオープン・リーディング・フレームの存在からジヒドロジピコリン酸レダクターゼをコードする遺伝子は後記配列表の配列番号: 1に示す塩基配列を有する249個のアミノ酸をコードする747塩基対より構成されていることが判明した。

【0034】実施例3

プラスミドpCRY30-dapBの調製およびコリネ型細菌への導入

(A) プラスミドpCRY30-dapBの調製

実施例1 (B) で得られたプラスミドpHSG298-dapB 5 μgを、各々 5 units の制限酵素XbaIおよびDraIと、37℃で1時間反応させて分解し、そのDNA分解物の末端部位を常法により処理して平滑末端とした。このDNA分解物とBamHIリンカー (宝酒造製) 1 μgとを混合した。混合液を65℃

で10分間加熱して酵素を失活させた後に、それぞれの最終濃度が50 mM トリス緩衝液 (pH 7.6)、10 mM ジチオスレイトール、1 mM ATP、10 mM MgCl₂、およびT4 DNAリガーゼ 1 unit となるように各成分を添加し、12℃で15時間反応させて結合させた。得られた連結DNAを制限酵素BamHI 3 units と37℃で1時間反応させて得られたDNA分解物と、特開平3-210184号公報に記載の方法に基づいて調製したプラスミドpCRY30 1 μgを制限酵素BamHI 1 unit と37℃で1時間反応させて得られたDNA分解物とを混合し、この混合液を65℃で10分間加熱して酵素を失活させた後に、それぞれの最終濃度が50 mM トリス緩衝液 (pH 7.6)、10 mM ジチオスレイトール、1 mM ATP、10 mM MgCl₂、およびT4 DNAリガーゼ 1 unit となるように各成分を添加し、12℃で15時間反応させて、DNA分解物を結合させた。

【0035】得られたプラスミド混液を用いて、前記実施例1 (B) に記載の常法により、前記エシェリヒア・コリCGSG4549株を形質転換し、カナマイシンを50 μg/ml の濃度で含有する選択培地 [組成: K₂HPO₄ 7 g、KH₂PO₄ 2 g、(NH₄)₂SO₄ 1 g、MgSO₄·7H₂O 0.1 g、グルコース 20 gおよび寒天 16 gを蒸留水に溶解して1 lとする] に塗抹した。この培地上に生育した菌株を常法により液体培養し、該培養液から常法によりプラスミドDNAを抽出した。抽出したプラスミドを制限酵素により分解し、得られた分解物をアガロースゲル電気泳動に供した結果、プラスミドpCRY30の大きさ約8.6 kbのDNA断片に加え、大きさ約800 bpの挿入DNA断片が認め

られた。

【0036】 (B) プラスミド pCRY30-dapB のコリネ型細菌への導入

上記の如く調整されたプラスミドDNAを、電気パルス法を用いて次のとおりコリネ型細菌へ形質転換した。プレバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497) プラスミド除去株を100mlの前記A培地で対数増殖期初期まで培養した後、ペニシリンGを1 unit/ml となるように添加してさらに2時間振盪培養した。培養菌体を遠心分離にて集め、20mlのパルス用溶液 [組成: 272mM シュクロース、7mM KH₂PO₄、1mM MgCl₂; pH7.4] にて洗浄した。再度、遠心分離にて菌体を集め、5mlのパルス用溶液に

懸濁し、0.75mlの細胞と前記(A)で得られたプラスミド溶液50μlとを混合し、氷中にて20分間静置した。ジーンパルサー (バイオラ社製) を用いて、2500ボルト、25μFDに設定し、パルスを印加後水中に20分間静置した。全量を3mlの前記A培地に移し、30℃にて1時間培養した後、カナマイシン 15 μg/ml (最終濃度) を含む前記A寒天培地に植菌して30℃で2~3日間培養した。出現したカナマイシン耐性株より、常法によりプラスミドを得た。このプラスミドを各種制限酵素で切断し、得られた切断断片の大きさを測定した。その結果を下記表3に示す。

【0037】

【表3】

表 3

プラスミド pCRY30-dapB

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
BamHI	2	0.8, 8.6
EcoRI	1	9.4
KpnI	1	9.4
XbaI	1	9.4

【0038】 上記表3に示した制限酵素の切断断片により特徴付けられるプラスミドを、“プラスミド pCRY30-dapB”、該プラスミドを保持する菌株を“プレバクテリウム・フラバムMJ233-dapB”とそれぞれ命名した。上記表3から明らかな如く、前記プラスミド pCRY30-dapB を制限酵素 BamHI で切断することにより、プラスミド pHSG298 に由来する大きさ8.6kbのDNA断片に加えて、ジヒドロジビコリン酸レダクターゼをコードする遺伝子を含む大きさ約800bpのDNA断片が確認された。なお、複合プラスミド pCRY30-dapB により形質転換されたプレバクテリウム・フラバムMJ233-dapBは、茨城県つくば市東1丁目1番3号の工業技術院生命工学工業技術研究所に、平成5年8月6日付けで受託番号: FERM P-13790 として寄託されている。

【0039】 実施例4

プラスミド pCRY30-dapB の安定性の確認
前記A培地 100ml を500ml 容三角フラスコに分注し、120℃で15分間滅菌処理した後、この培地に実施例3で得たプレバクテリウム・フラバムMJ233-dapB を植菌し、30℃で24時間の振盪培養を行った。次いで、同様にしてA培地100ml を500ml 容三角フラスコに分注して120℃で15分間滅

菌した培地に、培地1ml 当たり50細胞の密度で植菌し、再度30℃で24時間の振盪培養を行った。培養物を遠心分離して菌体を回収し、回収した菌体を洗浄した。得られた菌体を、カナマイシンを15 μg/ml の濃度で添加した平板A培地およびカナマイシン無添加の平板A培地に一定量塗抹し、30℃で1日培養した後、生育したコロニーの数を計測した。また、カナマイシン無添加のA培地上に生育したコロニーの菌株については、カナマイシン添加A培地上での生育の可否も調査した。その結果、カナマイシン添加A培地および無添加A培地における生育コロニー数は同数であり、さらにカナマイシン無添加A培地上に生育したコロニーの菌株は全てカナマイシン添加A培地上に生育可能であった。これにより、本発明のプラスミド pCRY30-dapB が高度の安定性を有することが確認された。

【0040】 実施例5

ジヒドロジビコリン酸レダクターゼの酵素活性測定

(A) ジヒドロジビコリン酸レダクターゼ活性測定用粗酵素液の調製

培地 [組成: 尿素 0.4%, 硫酸アンモニウム 1.4%, リン酸-カリウム 0.05%, リン酸二カリウム 0.05%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, CaCl₂·2H₂O 2ppm, FeSO₄·7H₂O 2ppm,

MnSO₄・4~6H₂O 2ppm、ZnSO₄・7H₂O 2ppm、NaCl 2ppm、ビオチン 200μg/l、塩酸チアミン 100μg/l、カザミノ酸 0.1%、酵母エキス 0.1%を蒸留水に溶解] 100mlを500ml容三角フラスコに分注して滅菌(滅菌後pH7.0)した後、プレバクテリウム・フラバムMJ233-dapBを植菌した。次いで5g/l(最終濃度)のグルコースを無菌的に添加し、30℃で2日間振盪培養を行った。次に、本培養培地〔組成:グルコース 5%、硫酸アンモニウム 2.3%、リン酸一カリウム 0.05%、リン酸二カリウム 0.05%、MgSO₄・7H₂O 0.5%、FeSO₄・7H₂O 20ppm、MnSO₄・4~6H₂O 20ppm、ビオチン 200μg/l、塩酸チアミン 100μg/l、カザミノ酸 0.3%、酵母エキス 0.3%を蒸留水に溶解] 1000mlを2l容通気攪拌槽に仕込み、120℃で20分間滅菌した後、この槽に前記振盪培養により得られた培養物20mlを添加し、回転数1000rpm、通気量1vvm、温度33℃、培地のpH7.6の培養条件下で24時間培養を行った。培養終了後、培養物500mlを遠心分離にかけて培養菌体を回収した。得られた菌体を脱塩蒸留水にて2回洗浄した後、該菌体を0.1Mリン酸緩衝液(pH6.8)3~5mlに懸濁し、これを超音波処理(3分間単位で3回、処理温度-10℃)して菌体を破碎した。菌体を破碎した後、破碎液を4℃で20分間、6,000rpmの遠心分離に供し、その上澄液を分取した。得られた上澄液、即ち菌体抽出液を粗酵素液として常法に従いジヒドロジピコリン酸レダクターゼ活性の測定に供した(TamirH., Meth. Enzymol. 17B, 134-139, 1971)。

【0041】(B) ジヒドロジピコリン酸レダクターゼの酵素活性測定

上記(A)で得た粗酵素液を50μl、基質であるジヒドロジピコリン酸を0.1M、さらに2mMのニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸:還元型(NADPH)またはニコチンアミドジヌクレオチド:還元型

(NADH)を20mM トリス塩酸リン酸緩衝液に溶解した補酵素液を800μl、それぞれ0.1Mリン酸カリウム緩衝液(pH6.8)に添加してジヒドロジピコリン酸レダクターゼ活性測定用反応液とし、これを30℃で数分間反応させた。ジヒドロジピコリン酸レダクターゼが1molのジヒドロジピコリン酸を還元する際には、補酵素であるNADPH(NADH)が1mol酸化されるので、還元型補酵素の減少量を測定することによりジヒドロジピコリン酸レダクターゼの活性を測定することができる。反応が終了した後、波長340nmにおける吸光度を測定してNADPHの減少量を測定したところ、プレバクテリウム・フラバムMJ233-dapBから調製した粗酵素液のジヒドロジピコリン酸レダクターゼ活性は、1.0unit/mgであった。また、プレバクテリウム・フラバムMJ-233(FERM BP-1497)を上記(A)と同一条件にて培養して粗酵素液を調製し、その粗酵素液を上記と同一条件にて基質と反応させてNADPHの減少量を測定した。測定の結果、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ活性は0.5 units/mgであった。

【0042】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 747

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 染色体DNA

起源

生物名: プレバクテリウム フラバム

株名: MJ-233

配列の特徴

特徴を表す記号: CDS

存在位置: 1-747

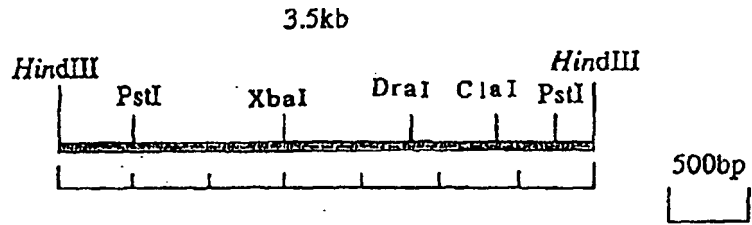
特徴を決定した方法: E

配列

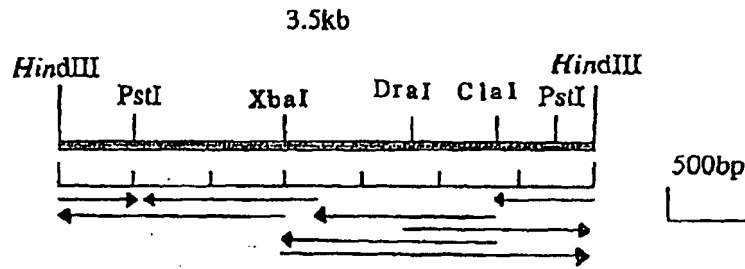
ATG GGA ATC AAG GTT GGC GTT CTC GGA GCC AAA GGC CGT GTT GGT CAA	48
Met Gly Ile Lys Val Gly Val Leu Gly Ala Lys Gly Arg Val Gly Gln	
1 5 10 15	
ACT ATT GTG GCA GCA GTC AAT GAG TCC GAT GAT CTG GAG CTT GTT GCA	96
Thr Ile Val Ala Ala Val Asn Glu Ser Asp Asp Leu Glu Leu Val Ala	
20 25 30	
GAG ATC GGC GTC GAC GAT GAT TTG AGC CTT CTG GTA GAC AAC GGC GCT	144
Glu Ile Gly Val Asp Asp Asp Leu Ser Leu Leu Val Asp Asn Gly Ala	
35 40 45	
GAA GTT GTC GTT GAC TTC ACC ACT CCT AAC GCT GTG ATG GGC AAC CTG	192
Glu Val Val Val Asp Phe Thr Thr Pro Asn Ala Val Met Gly Asn Leu	
50 55 60	
GAG TTC TGC ATC AAC AAC GGC ATT TCT GCG GTT GTT GGA ACC ACG GGC	240

- 11 -

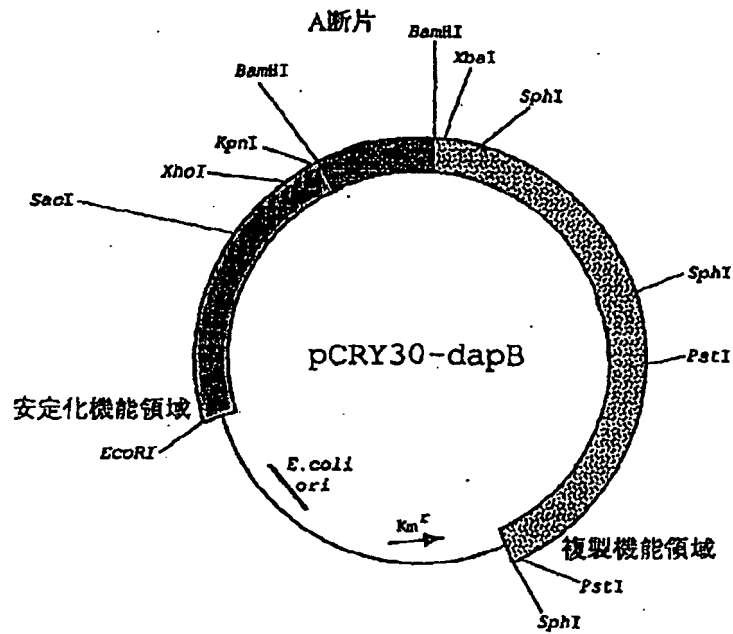
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 R 1:13)

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:15)

C 1 2 R 1:13)